Über Bakterienzoogloeenbildung an den Wurzeln der Gerstenpflanze

von

Dr. Heinrich Zikes,

Privatdozent der Bakteriologie an der k. k. Wiener Universität.

Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der k. k. Wiener Universität.

(Vorgelegt in der Sitzung am 7. Jänner 1910.)

Aus zahlreichen Arbeiten der neueren Literatur geht mit großer Bestimmtheit hervor, daß gewisse Pflanzen oder pflanzliche Produkte, wie Früchte, als Aufenthaltsort ganz bestimmter Bakterienarten aufgefaßt werden müssen. So fänd Beijerinck (1) verschiedene Arten von Buttersäurebakterien auf Getreidekörnern, Fribes (2) beobachtete den Erreger der Flachsröste regelmäßig auf Flachsblättern, Behrens (3) konnte ein ständiges Vorkommen einer die Hanfröste verursachenden Bakterienart auf den Blättern des Hanfes beobachten. Burri (4) sah eine Anzahl typischer Bakterienarten, wie den *Bacillus mesentericus aureus* (Winkler), das *Bacterium fluorescens*, *Bacterium putidum* regelmäßig auftreten, als er größere Versuchsreihen zu dem Zwecke anstellte, um den Keimreichtum verschiedener Laubblätter, Blätter von Gemüsen und Futterpflanzen, von Gras- und Kleearten kennen zu lernen. Er fand hierbei, daß der Keimgehalt auf Blättern überhaupt außerordentlich hohe Zahlen aufweist, unter welchen mehrere Millionen Keime pro Gramm völlig gesunder Blätter keine Seltenheit waren. Burri sprach daher die Meinung aus, daß »das Bild der Bakterienflora einer Pflanze nicht die Summe der durch Luftströmungen, Insekten, Düngung auf die Pflanzen gelangten Bakterien darstellt, sondern der Hauptsache nach das Ergebnis einer während des Wachstums der Pflanze auf der Oberfläche derselben statt-

gefundenen lebhaften Bakterienvermehrung ist«. Sein Schüler Düggeli (5) hat dann diese Arbeit fortgesetzt und erweitert. Auch er erkannte die dominierende Stellung des *Bacillus mesentericus aureus* (Winkler) oder *Bacterium herbicola aureum*, wie er diese Bakterienart nannte, unter der Flora der untersuchten Blätter, ja, er sah, daß nicht selten die ganze Mikrobenflora einer Pflanze nur aus dieser Bakterienart besteht, welche, wie aus anderen Untersuchungen hervorgeht, nicht zu den eigentlichen Luftbakterien gehört. Daneben beobachtete er das Auftreten von *Bacterium fluorescens* (Flügge) L. u. N., *Bacterium putidum* (Flügge) L. u. N. und *Bacterium herbicola rubrum* n. sp. sowie in geringerer Menge von *Bacillus mesentericus* (Flügge) L. u. N., *Bacillus vulgatus* (Flügge) Migula, *Bacterium coli* (Flügge) L. u. N. und anderer. Düggeli dehnte im Anschluß hieran seine Untersuchungen auf die Mikroflora von Früchten und Samen verschiedener landwirtschaftlicher Gewächse aus. Schon früher hatten in dieser Richtung Hoffmann (6) und Chrzaszcz (7) Beobachtungen angestellt. Hoffmann beschränkte sich bei seinen Untersuchungen lediglich auf die Feststellung der Keimzahl verschiedener Halmfrüchte an sich sowie auf die Keimzahlbestimmung der Nährgelatine verflüssigenden Bakterien und der auf Würzeagar auftretenden Hefen und Schimmelpilze, ohne jedoch näher auf die Identifizierung der gefundenen Keime einzugehen. Chrzaszcz untersuchte die unter den Spelzen der Gerstenfrucht befindlichen Mikroorganismen und richtete sein Hauptaugenmerk auf die unter und auf den Schüppchen (Lodiculae) sitzenden Keime. Auch er fand, gleich Düggeli, in vorherrschender Menge *Bacterium herbicola aureum*. Düggeli überprüfte 55 verschiedene gesunde Saatproben, indem er die Samen unter Wasserzusatz zerrieb und mit entsprechenden Mengen des entstandenen Breies nach starker Verdünnung mit Wasser Nährgelatineplatten goß. Es kamen von Gramineensamen Hafer, Gerste, Weizen und Roggen zur Untersuchung. Auch bei diesen Proben konnte ein enormer Keimgehalt nachgewiesen werden; so wurden unter anderen pro Gerstenfrucht 30.000 bis 80.000 Keime gefunden. Unter den identifizierten Keimen ragt quantitativ wieder *Bacterium*

herbicola aureum hervor. Fast 40% der Proben waren ausschließlich von dieser Bakterienart bewohnt und nur etwa 10% waren frei von derselben.

In quantitativer Beziehung spielte *Bacterium fluorescens* die zweitwichtigste Rolle, bildete aber im Gegensatz zu ersterem nirgends eine Reinkultur. Außerdem wurden noch in geringerer Menge *Bacterium putidum, Bacillus megatherium, Bacillus vulgatus, Bacterium coli* konstatiert. Nach der Ansicht Düggeli's handelt es sich bei *Bacterium herbicola aureum, Bacterium fluorescens* und *Bacterium putidum* um eine direkte Infektion des gesunden Samens von der Mutterpflanze aus, da diese drei Bakterienspezies auch auf der gesunden Pflanze dominieren, während alle übrigen als zufällige Bewohner der Samen anzusehen sind. Außer auf Samen untersuchte Düggeli auch den Bakteriengehalt auf jugendlichen Keimpflanzen, welche in sterilem Sande gezogen worden waren. Düggeli konnte nachweisen, daß während des Keimens der Samen eine starke Vermehrung der Flora eintritt. Die Zahl der Mikroorganismen auf den Keimpflanzen war zumeist ein Vielfaches, mindestens das Sechsfache derjenigen, die auf dem entsprechenden Saatmateriale vorhanden war. Auch die auf den Keimlingen vorherrschenden Bakterien erwiesen sich mit den auf den Samen dominierenden als vollkommen identisch.

Bacterium herbicola aureum und *Bacterium fluorescens* nahmen wieder die hervorragende Stellung wie auf den Samen ein. Bei diesen Untersuchungen erkannte Düggeli, daß speziell die Wurzeln der Pflanzen ganz besonders reich an Bakterien sind. Von den Wurzeln aus konnte weiter eine allmähliche Infektion des dieselben umgebenden Sandes konstatiert werden, indem von ihnen aus durch kapillare Wasserströmung in Verbindung mit aktiver Beweglichkeit der Bakterienstäbchen eine Ausbreitung der Organismen in den sterilisierten angefeuchteten Sand stattfindet. Auch hier waren *Bacterium herbicola aureum* und *Bacterium fluorescens* in überwiegender Menge zu finden. Zuweilen wurden aber Unregelmäßigkeiten bei der Ausbreitung der Bakterien im Boden gefunden, was namentlich dann eintrat, wenn an Stelle sterilen Sandes sterile Gartenerde verwendet wurde. Die Ausbreitung der von den Samen stammenden

Organismen ist offenbar von einer Reihe äußerer Faktoren abhängig, wie Verschiedenheit im Feuchtigkeitsgehalt, im Nährstoffgehalt des Keimbettes, welche zu dieser unregelmäßigen Verbreitung der Organismen führen. Düggeli schloß seine Untersuchungen mit der Feststellung der Flora des Vegetationswassers ab, welches vom keimenden Samen abgeschieden wird.

Obwohl das Vegetationswasser nach F. Haberlandt nur einen Trockenrückstand von 0·05 bis 0·1% ergibt, also gewiß keinen besonderen Anspruch auf Nährwert erheben kann, fand Düggeli für dieses ganz besonders hohe Keimzahlen.

Durch die Arbeit Düggeli's, die ich im vorliegenden in ihren wichtigsten Zügen deshalb etwas genauer wiedergegeben habe, da sie manche Beobachtung meiner eigenen Arbeit stützt, wurde, kurz zusammenfassend, festgelegt, daß sowohl auf gesunden Samen wie auf aus diesen hervorgehenden Keimpflänzchen, wie aber ganz besonders an den Wurzeln derselben eine überaus starke Vermehrung verschiedener Mikroben vor sich geht.

Daß sich speziell an den Wurzeln von Gerstenkeimlingen oft ein sehr reiches Bakterienleben abspielt, sieht man fast stets bei Anstellung des Keimversuches im sogenannten Schönjahn'schen Apparat. Derselbe besteht bekanntlich aus einer etwa 1 *dm* hohen, mit Wasser am Boden beschickten Glasschale, welche im Inneren etwas unter dem Rande einen ringförmigen Wulst trägt, der einer perforierten Porzellanscheibe als Unterlage dient. In die konischen, unten offenen Vertiefungen derselben werden die einzelnen Gerstenkörner gesteckt und mit Sand überschichtet, der mit Wasser befeuchtet und mit einer Filzscheibe überdeckt wird. Bei der Bestimmung der Keimungsenergie und Keimfähigkeit der Gerste in diesem Apparat findet man sehr häufig am Ende der sich frei in die Luft entwickelnden Wurzeln eigentümliche schleimige Überzüge von Tropfenform, die bald gelb, bald rot gefärbt erscheinen. Bei einer mikroskopischen Untersuchung erweisen sich diese Gebilde als Bakterienzoogloeen, welche Millionen von Bakterien, hie und da auch Sproßpilze eingeschlossen enthalten. Diese Bildungen sind so häufig, daß sie wohl jedem, der sich mit der Keimuntersuchung im Schönjahn'schen Apparat

beschäftigt hat, aufgefallen sein dürften. Sie erscheinen anfänglich sehr schwach entwickelt, nach etwa sieben bis acht Tagen aber, zur Zeit der Keimfähigkeitsbestimmung, schon ziemlich kräftig ausgebildet und zumeist von der Größe eines normalen Tropfens.

Diese Bakterienzoogloeen gaben nun Veranlassung zu vorliegender Arbeit, durch welche folgende Fragen beantwortet werden sollten:

1. Welche Bakterienarten kommen in diesen Zoogloeen vor?
2. welche Art der identifizierten Bakterien ist die eigentliche Ursache an der Zoogloeenbildung?
3. welche Schädigungen erfährt die Pflanze durch dieselben?

Zur Beantwortung der ersten Frage wurde der ganze Apparat vor dem Einsetzen der Probe, zu welcher ich eine Hannagerste verwendete, durch gründliches Abflammen sterilisiert und als Beschickung desselben völlig steriles Wasser verwendet. Die Gerstenkörner wurden mittels steriler Pinzette in die Vertiefungen der Porzellanplatte gesetzt und mit Sand bedeckt, der zuvor durch zweistündiges Ausglühen sterilisiert worden war und nach der Auftragung mit sterilem Wasser befeuchtet wurde. Als Abschluß gegen einfallende Luftkeime diente eine sehr gut abflambierte Glasglocke.

Bei der geschilderten Anordnung konnten sich auf den Gerstenwurzeln nur Bakterienarten entwickeln, die schon früher auf und in den Samen vorhanden waren. Nach acht Tagen hatten sich an zahlreichen Wurzeln Zoogloeen gebildet, die an einer größeren Anzahl Wurzeln einen gelben, an einer geringeren einen roten Farbenton erkennen ließen. Ich entnahm nun verschiedene Proben teils aus den gelben, teils aus den roten Zoogloeen, übertrug dieselben in gewöhnliche Nährgelatine und legte von dieser Suspension mehrere Verdünnungen an, die zu Platten gegossen wurden. Auf diesen entwickelten sich verschiedene Bakterienarten, und zwar aus den gelben Zoogloen vorzüglich zwei Arten, aus den roten eine Art. Aus einer gelben Zoogloee konnte einmal auch noch eine dritte Art in größerer Menge isoliert werden.

Die isolierten vier Bakterienstämme wurden hierauf durch nochmalige Überimpfung auf Gelatine, Anlage von Platten-

kulturen auf ihre Reinheit überprüft und die auf letzteren aufgegangenen Kolonien als Ausgangsmaterial für die weiteren Untersuchungen benutzt, wobei hinzuzufügen ist, daß jede der Bakterienarten in drei Parallelkulturen zur weiteren Untersuchung gelangte.

Zur Charakterisierung derselben mag folgende Tabelle dienen.

Nr. 1 erweist sich als *Bacterium fluorescens liquefaciens*, wie aus einem genauen Vergleich der diesbezüglichen Beschreibungen von Migula, Günther, Metz, Matzuschita, Lehmann und Neumann hervorgeht. Hierfür sprachen besonders folgende Eigentümlichkeiten: die lophotriche (monopolare) Begeißelung, die Größe der Organismen, die Fluoreszenz der Gelatine- und Agarnährböden sowie der Nährbouillon, das Fehlen fast jeden Wachstums in den tieferen Schichten der Gelatinestichkultur, der grauweiße Belag auf der Kartoffel, die Zersetzung der Milch, die Nichtzerklüftung von Zuckeragar.

Nr. 2 zeigt eine große Ähnlichkeit mit dem von Düggeli beschriebenen *Bacterium herbicola aureum*, jedoch ist die Farbstoffproduktion eine wesentlich geringere und langsamere. So sagt Düggeli über die Gelatineplattenkultur seines *Bacterium herbicola aureum*: »Die Oberflächenkolonien sind auf dünnbesetzten Platten nach 48^h grauliche, ins Bläuliche schimmernde, durchscheinende Tröpfchen, die später am Rande seicht gebuchtet werden. Nach 2—4 Tagen treten in den inzwischen goldgelb gewordenen Kolonien runde Zoogloeen auf. Die Gelatine wird langsam erweicht.« Bei *Bacterium herbicola aureum* tritt also sehr rasch, nach zwei bis vier Tagen, eine Gelbfärbung der Kolonien ein, bei dem von mir isolierten Mikroben dauerte es aber 10 bis 14 Tage, bis eine nur schwache Gelbfärbung des Belages wahrnehmbar wurde. Auch auf der Kartoffel bildet *Bacterium herbicola aureum* sehr bald goldgelbe, saftig glänzende Auflagerungen, während die von mir isolierte Art anfänglich grauschleimige Beläge bildet, die sich erst nach und nach gelb färben. Ansonst ist aber eine große Übereinstimmung zu konstatieren, so in der Größe der Stäbchen, in ihrer Begeißelung, in der überaus langsamen Verflüssigung der Nährgelatine, über welche sich Düggeli nur

als eine Art Erweichen des Nährbodens äußert, in dem Verhalten zur Milch, die bei *Bacterium herbicola aureum* anfänglich gleichfalls längere Zeit unverändert bleibt und erst später langsam unter Milchsäurebildung koaguliert, endlich in der verhältnismäßig kräftigen Indolreaktion. Ich nehme daher keinen Anstand, diese Art als dem *Bacterium herbicola aureum* sehr nahestehend oder sogar als Standortvarietät desselben zu bezeichnen.

Nr. 3 scheint nur zufällig in den Zoogloeen vorzukommen, da ich diese Art nur von den Wurzeln eines Pflänzchens isolieren konnte. Nach Vergleich mit bereits beschriebenen Bakterienarten dürfte sie mit *Bacterium rubrum* identisch sein, welche Art von Cohn zuerst an Reiskörnern gefunden wurde.

Nr. 4 stimmt bei sehr geringer Abweichung vereinzelter Wachstumseigentümlichkeiten sehr gut mit dem von Düggeli beschriebenen *Bacterium herbicola rubrum* überein. Düggeli beobachtete 1 bis 2 μ lange, 0·6 μ breite Stäbchen, welche nach Gram nicht färbbar sind, die Gelatine nicht verflüssigen, sondern auf derselben kolonartige Beläge liefern und am Stich bis tief in die Gelatine gut gedeihen. Die Gelatinekolonien weisen nach Düggeli's Beschreibung eine bläulichrote Farbe auf, die auf Agar entstandenen zeichnen sich durch eine sehr geringe Farbstoffproduktion aus. Im Traubenzuckeragar ist ein gleichmäßiges Wachstum im ganzen Stich zu beobachten, ohne daß jedoch Zerklüftung eintritt. Die Bouillonkultur zeigt eine zarte Decke, stark getrübte Flüssigkeit, reichlichen schleimigen Bodensatz. Der Belag auf Kartoffelscheiben ist manganrot?, dick, unregelmäßig begrenzt und saftig glänzend. Die Kartoffel wird in der Umgebung rot verfärbt. Dargebotenes Nitrat wird nur langsam in Nitrit überführt und in sieben Tage alten Kulturen tritt starke Indolbildung auf.

Es wurde nun versucht, mit diesen Reinzuchten auf völlig bakterienfreien Wurzeln wieder die Zoogloeenbildung herbeizuführen. Es mußten zu diesem Zweck die einzelnen Bakterienarten auf keimfreien Wurzeln in Reinkultur ausgesäet und eine eventuelle Zoogloeenbildung beobachtet werden oder, falls eine solche ausblieb, mußten die Bakterien in Symbiose zur Einwirkung gebracht und dann eine eventuelle Schleim-, beziehungsweise Zoogloeenentwicklung festgestellt werden.

Nr.	Gestalt	Kolonienform auf Nährgelatine	Stichkultur, Nährgelatine	Strichkultur, Nähragar
1 Aus der gelben Zoogloee	auf Agar bewegliche Stäbchen, 2 bis 3 μ lang, 1 μ breit	Oberflächenkolonie zeigt in der Mitte flockige Ausscheidungen, verflüssigt schalenförmig unter Vorschiebung eines Haarkranzes Versenkte Kolonien gelblich, rund Fluoreszenz des Nährbodens	Im Stich kein Wachstum, ausgesprochen aerob, weiße, feste Haut, Verflüssigung schalenförmig, dann zonenförmig; flockige Ausscheidungen, gelblicher Bodensatz Fluoreszens des Nährbodens	Dünne hyaline Auflagerung Fluoreszenz des Nährbodens
2 Aus der gelben Zoogloee	Auf Agar bewegliche Stäbchen, 1·5 bis 2 μ lang, 0·8 μ breit	Oberflächenkolonie zeigt anfänglich eine hyaline unregelmäßige Form, später tritt eine sehr schwache Verflüssigung auf. Auflage wird schwach gelb Versenkte Kolonien rund glattrandig, in der Mitte dunklere Färbung	Weißer, gebuchteter Belag, unter demselben sehr schwache Verflüssigung, zähschleimig, fadenziehend; im Stich kugelige Anlagerungen; Auflage wird schwach gelb, aber erst nach 10 bis 14 Tagen	Belag hyalin, glänzend, schleimig
3 In einer gelben Zoogloee häufiger gefunden	Auf Agar bewegliche Stäbchen, 3 bis 5 μ lang Die meisten Organismen 4 bis 5 μ lang, 1·5 μ breit	Oberflächenkolonien in der Mitte flockig, ziemlich rasche Verflüssigung der Gelatine, schwacher Strahlenkranz Versenkte Kolonien rund, dunkel gefärbt, schwach verflüssigend	Schwach schalenförmig verflüssigend, schwach rötliche Auflagerung mit Haarkranz in die Gelatine vordringend, im Stich schwach entwickelt	Rote Auflagerung von schleimig-fadenziehender Konsistenz
4 Aus der roten Zoogloee	Auf Agar bewegliche Stäbchen, 1·5 bis 2 μ lang, 0·8 μ breit	Oberflächenkolonie zuerst kreisrund, dann unregelmäßig werdend, mit schwachen Ernährungslinien, in der Mitte violett, fein granuliert Versenkte Kolonien rund, dunkel gefärbt	Nicht verflüssigend, kräftige rötlichweiße Auflagerung, schwach gebuchtet; am Stich kräftige kugelige Anlagerungen	Weißer hyaliner Belag

Nährbouillon	Peptonwasser	Kartoffel	Milch	Stichkultur, Glukoseagar	Gram'sche Färbung, Begeißelung
Gleichmäßig schwach getrübt Keine H_2S-Entwicklung Fluoreszenz des Nährbodens	Gleichmäßig schwach getrübt Geringe Menge Indol, keine Nitritbildung	Grauweiße schleimige Auflagerung, schlechter Geruch, später sehr fest anliegend, fast kaum abhebbar Keine Sporulation	Wurde zersetzt, reagiert alkalisch, riecht schwach putrid	Flache, weiße Auflage, in der Mitte abgeflacht, glattrandig, später gelblich werdend; im Stich sehr schwache Entwicklung, ohne Zerklüftung Fluoreszenz des Nährbodens	Gram negativ Monopolare lophotriche Begeißelung
Stark getrübt, kräftiger Bodensatz Deutliche H_2S-Reaktion innerhalb 1/4 Stunde	Schwach getrübt, ziemlich starker Bodensatz Ziemlich starke Indolbildung, keine Nitritbildung	Grauer schleimiger Belag, feucht, am untersten Ende der Kartoffel später gelb werdend Keine Sporulation	Nicht verändert, amphotere Reaktion, später partiell koaguliert, wahrscheinlich durch Milchsäureproduktion	Weißer, mehr trockener, glänzender Belag, später schleimig, schwach fadenziehend werdend; im Stich kugelige Anlagerungen, ohne Zerklüftung des Agars	Gram negativ Monopolare monotriche Begeißelung
Gleichmäßig schwach getrübt Keine H_2S-Reaktion	Fast kaum wachsend Sehr schwache Indol-, keine Nitritbildung	Orangeroter, schwach schleimiger, feuchter Belag, zähflüssig, fadenziehend Keine Sporulation	An der Oberfläche rötlich gefärbt, koaguliert bei amphoterer Reaktion durch eine Koagulase, mit nachfolgender Verflüssigung des Koagulums durch Kasease	Erhabene, dicke, schleimige, rötlichweiße Auflagerung; im Stich keine Zerklüftung, mit kugeligen Anlagerungen	Gram schwach positiv Peritriche Begeißelung
Sehr schwache Haut- und stärkere Ringbildung, stark getrübt, starker Bodensatz H_2S-Bildung deutlich innerhalb 1/4 Stunde	Opaleszent, schwaches Sediment Ziemlich kräftige Indol-, keine Nitritbildung	Feuchter, zuerst gelbgrauer, dann immer deutlicher rot werdender Belag; die Kartoffel färbt sich später deutlich rot Keine Sporulation	Scheinbar nicht verändert, zeigt amphotere Reaktion, später schwach sauer werdend	Rötlichweißer schleimiger Belag; im Stich keine Zerklüftung, schwache kugelige Anlagerungen am Stich	Gram negativ Peritriche Begeißelung

Ich benutzte hierzu zuerst die Nährgelatine-, später die Glyzerinagarkulturen, ohne jedoch einen Erfolg zu erzielen. Der physiologische Zustand der Organismen war durch das öftere Umzüchten auf diesen Nährböden derart verändert worden, daß ihr Wachstum auf den Wurzeln zumeist ganz ausblieb oder ein sehr geschwächtes war, geschweige denn Zoogloeenbildungen zustande kamen.

Später konstruierte ich mir direkt aus den Gerstenwurzeln einen elektiven Nährboden mit Agar, der sich für den gedachten Zweck sehr gut eignete. Dieser Agar wurde in der Weise hergestellt, daß ich zirka 100 *g* Gerstenwurzeln mit 1 *l* Wasser durch eine Stunde auskochte und in dem Filtrat 0·5% Saccharose und 0·25% Asparagin zur Lösung brachte. Die Lösung wurde dann neuerdings filtriert und mit $1^1/_2$% Agar-Agar zu einer Gallerte aufgekocht. Der resultierende Agarnährboden wurde mittels kohlensauren Natrons bis zur amphoteren Reaktion neutralisiert und schließlich wieder filtriert. Dieser Nährboden, welcher alle aus der Wurzel extrahierbaren Substanzen, wie auch die genannten Zusätze in Lösung enthielt, gab nicht allein zu einem Wiedererwachen der Bakterienvirulenz gegenüber den Wurzeln in genügender Weise Veranlassung, sondern erwies sich auch für die Aufzucht derselben sehr geeignet, indem sich die Organismen auf diesem Nährsubstrat sehr gut, jedenfalls besser als auf allen übrigen dargebotenen Nährböden entwickelten. Die Wachstumsbilder auf diesem Nährboden waren folgende:

Bacterium fluorescens liquefaciens bildet einen dünnen hyalinen Belag, im Kondenswasser kommt es zu flockigen Ausscheidungen, der Nährboden nimmt starke Fluoreszenz an. Der Farbenton derselben ist gleich zu Anfang grünlich und nicht blau, obwohl der Nährboden streng neutral reagierte, und bleibt diese Farbe erhalten, woraus zu schließen ist, daß diese Bakterienart in Gerstenwurzelagar entgegen dem Verhalten in gewöhnlichem Nähragar oder Nährgelatine gleich zu Anfang der Entwicklung größere Mengen von Ammoniak produziert, während sie, auf gewöhnlicher Gelatine oder Agar gezüchtet, erst allmählich in größerem Maße Ammoniak entwickelt, so daß der Nährboden anfänglich in blauer und erst

später in grüner Farbe fluoresziert. *Bacterium herbicola aureum* (var.) bildet einen kräftigen, schleimigen, stark fadenziehenden Belag, *Bacterium rubrum* eine dünne, hyaline, rötliche Auflagerung unter Bildung rötlicher flockiger Ausscheidungen im Kondenswasser. *Bacterium herbicola rubrum* endlich vermehrt sich sehr kräftig unter Bildung eines schwach schleimigen, fadenziehenden Belages.

Die Infektion der Wurzeln wurde an Keimpflanzen vorgenommen, die aus sterilisierten Körnern hervorgegangen und unter Vermeidung jeder Außeninfektion herangezüchtet worden waren. Die Sterilisierung der Körner gelang, indem sie während zehn Minuten der desinfizierenden Wirkung von chemisch reinem Schwefeläther ausgesetzt wurden. Blinde Versuche ergaben, daß die Körner durch diese Behandlung, ohne an ihrer Keimfähigkeit zu verlieren, mit ganz wenigen Ausnahmen sterilisiert werden können, wenigstens erwiesen nachträglich an den Wurzeln ausgeführte mikroskopische Untersuchungen keine wie immer geartete Bakterienentwicklung. Es wurde nun je ein Korn in ein kleines steriles Glastrichterchen von etwa 2·5 *cm* oberer Weite gebracht, dessen unteres Ende derart verjüngt war, daß die eingeführten Körner die Öffnung nahezu verschlossen. Die Trichter wurden auf sterile, zirka 3·5 *cm* hohe, 2·5 *cm* weite Glaszylinder mit flachem Boden gesetzt, in die zuvor eine geringe Menge sterilen Wassers gegossen worden war. Nach dem Zusammenfügen der kleinen Kulturapparate wurde in jeden Trichter eine kleine Menge sterilen Sandes geschüttet, der hierauf mit Wasser befeuchtet wurde. Sämtliche Kulturgefäßchen nahm eine zuvor durch Abflambieren sterilisierte feuchte Kammer auf. Vorliegende Angaben machen es ersichtlich, daß die Entwicklung der Keime in derselben Weise erfolgen konnte wie im Schönjahnschen Apparat. Die Infektion selbst wurde in der Weise ausgeführt, daß einerseits auf $^1/_2$ *cm* lang gewordene Wurzeln von je vier Versuchspflänzchen die betreffende Bakterienart aufgetragen wurde, andrerseits die Auftragung der Bakterien in einer zweiten Serie von Versuchen schon beim Spitzen des Wurzelkeimes vorgenommen wurde, also zu einem Zeitpunkte, in welchem die Wurzeln noch nicht an der Oberfläche

erscheinen, sondern nur die Wurzelscheide sichtbar wird, die sich durch den Wurzeldruck nach Zerreißen der Fruchtwand und Samenhaut zwischen der Palea superior und Palea inferior hervorschiebt. In beiden Fällen trat durch *Bacterium fluorescens liquefaciens* und *Bacterium herbicola rubrum* eine deutliche Zoogloeenbildung an den Wurzeln auf. Bei ersterem hatte die Bakterienanhäufung eine gelbe, bei letzterem eine rote Farbe. Von den beiden anderen Arten rief die dem *Bacterium herbicola aureum* nahestehende nur eine schwache Entwicklung von Zoogloeen hervor, während die Wurzeln nach der Infektion mit *Bacterium rubrum* gar keine Ausbreitung der aufgetragenen Organismen erkennen ließen. Als dann später die Versuche bei gleichzeitiger Aussaat von *Bacterium fluorescens liquefaciens* und *Bacterium herbicola aureum* (var.) wiederholt wurden, ergab sich die interessante Tatsache, daß die durch Symbiose dieser beiden Bakterienarten entstandenen Zoogloeen an sämtlichen vier Versuchspflänzchen noch viel kräftiger waren als die durch eine dieser Bakterienarten allein erzeugten.

In allen Fällen, als Zoogloeenbildung durch diese rein gezüchteten Bakterienarten eintrat, was besonders betont sein mag, also rote Zoogloeenbildung durch *Bacterium herbicola rubrum* und gelbe Zoogloeenbildung namentlich durch die Symbiose von *Bacterium fluorescens liquefaciens* und *Bacterium herbicola aureum* (var.), wiesen die ergriffenen Wurzeln schon makroskopisch deutliche Degenerationserscheinungen auf. Die Würzelchen blieben in ihrem Wachstum zurück und erlangten höchstens den dritten Teil der Länge gesunder, intakter Wurzeln. Die Würzelchen waren oft eingerollt oder in anderer Weise verzogen.

Es war nun festzustellen, ob die Bakterien nur außen um die Wurzelhaube und um die Epidermis an den oberen Teilen der Wurzel zur Entwicklung kommen oder ob sie auch zwischen den Wurzelhaubenzellen, beziehungsweise in den Interzellularen tiefer gelegener Zellschichten sich vermehren oder dieselben etwa gar in die Zellen der einen oder anderen Schichte einzudringen vermögen. Zur Beantwortung dieser Fragen wurden anfänglich die infizierten Wurzeln in der üblichen Weise durch Flemming's Chromosmiumessigsäure während zweier Tage

fixiert, dann in fließendem Leitungswasser gewaschen, in Alkohol mit steigender Konzentration entwässert und durch Chloroform in Paraffin von 45° Schmelzpunkt, schließlich definitiv in solches vom Schmelzpunkt 52° überführt. Nach dieser Methode erhielt ich aber bei einer entsprechenden Färbung, auf die ich gleich näher weiter unten eingehen will, keine befriedigenden Resultate. Die Bakterien, welche sich hauptsächlich an der Oberfläche der Wurzelhaube anhäufen, waren durch die geschilderten vielfachen Operationen gänzlich weggewaschen und auch die zwischen den Wurzelhaubenzellen sitzenden Organismen waren entfernt worden. Ich wendete dann später ein viel einfacheres Verfahren an, welches für meinen Zweck ganz entsprechende Resultate lieferte und vollständig für eine Orientierung hinreichte. Es bestand in Folgendem:

Die Zoogloeen aufweisenden Wurzeln wurden vorsichtig in absoluten Alkohol eingebracht und daselbst durch sechs Stunden belassen oder, was noch besser entsprach, in Pfeifer-sches Gemisch eingetragen und durch eine halbe Stunde dessen fixierender und härtender Wirkung ausgesetzt. Hierauf legte ich sie behutsam zwischen zwei Hollundermarkstücke ein und spannte diese sehr vorsichtig in ein Mikrotom. Die angefertigten Schnitte hatten eine Dicke von 0·02 *mm*, was für vorliegenden Zweck vollständig hinreichte. Vor der Färbung wurden sie mit Wasser, bereits auf dem Objektträger liegend, durch eine Minute behandelt. Nachdem dieses hierauf mittels Filterpapieres entfernt worden war, wurde die Farbstofflösung zur Einwirkung gebracht. Dieselbe bestand aus einer Löffler'schen Lösung von Methylenblau, einem Gemisch von 30 Teilen gesättigter alkoholischer Methylenblaulösung und 100 Teilen wässeriger, sehr schwacher Kalihydratlösung (1 : 10.000). In dieser Lösung blieben die Schnitte drei Minuten. Hierauf wurde die Farbstofflösung mittels Filterpapieres sehr vorsichtig abgesaugt, die Schnitte auf dem Objektträger durch kurze Zeit (fünf Minuten) einigemal mit Wasser unter Absaugen desselben mittels Filterpapieres ausgewaschen und endlich mit einer sehr verdünnten, ungefähr 0·8prozentigen Essigsäure entfärbt. Während deren Einwirkung wurde der Schnitt unter ständiger mikroskopischer Beobachtung gehalten. Hierbei konnte festgestellt werden, daß

die äußeren Zellelemente der Gerstenwurzel sich nach und nach entfärbten, während die vorhandenen Bakterienzellen lange Zeit eine deutliche Färbung behielten. Die Nuance der Farbstoffeinlagerung spielte in denselben nach Blauviolett über, während die noch gefärbt gebliebenen zentralen Teile der Wurzel eine deutliche azurblaue Farbe erkennen ließen. Auf diesem Wege war es mir möglich, ziemlich genau den Sitz der Bakterien zu eruieren.

a) Bacterium fluorescens liquefaciens.

Die Zoogloeenbildung dieser Bakterienart umgab die Wurzelhaube und an den oberen Teilen der Wurzel die eigentliche Außenhaut; die Organismen lagen auch dicht gedrängt zwischen den sich voneinander lösenden Wurzelhaubenzellen, jedoch war es nicht möglich, dieselben auch in tiefer gelegenen Teilen der Wurzel zu beobachten. Dagegen enthielten viele Wurzelhaubenzellen sowie vereinzelte Zellen der Oberhaut auch im Innern Bakterien. Diese Zellen erschienen sehr deformiert. Die Anwesenheit von Bakterien in den Wurzelhaubenzellen konnte ich übrigens auch direkt nachweisen, indem ich die äußersten Enden der Wurzeln, ohne Dünnschnitte anzufertigen, direkt der geschilderten Färbung, beziehungsweise Entfärbung unterzog und unter dem Mikroskop beobachtete. Auch hier zeigte sich, daß viele Zellen der Wurzelhaube im Inneren oft dicht mit Bakterien erfüllt waren, die sich zu einer Art dickem Faden aneinandergereiht hatten.

b) Bacterium fluorescens liquefaciens und Bacterium herbicola aureum (var.) in Symbiose.

Die Zoogloeenbildung ist in diesem Falle eine viel kräftigere, die Viskosität der Bildung eine viel höhere als bei alleiniger Einwirkung von *Bacterium fluorescens liquefaciens*. Die Korrodierung der Wurzeln erwies sich bedeutend stärker. Nicht allein zahlreiche Wurzelhaubenzellen, sondern auch viele Oberhautzellen waren dicht mit Bakterien gefüllt. Unter dem Mikroskop beobachtet, scheinen die Bakterien in der Zoogloe in Form kleiner, kugeliger, dicht aneinander sitzender Ballen

vereinigt zu sein. Merkwürdigerweise übt das *Bacterium herbicola aureum* für sich allein fast kaum eine Schädigung aus. Die Wurzeln erlangten ihre normale Länge, obwohl eine gewisse Zunahme der Bakterien unter schwacher Zoogloeenbildung auch hier bemerkbar war.

c) Bacterium herbicola rubrum.

Die Ausbreitung dieser Bakterienart war so ziemlich die gleiche wie die des *Bacterium fluorescens liquefaciens*, nur kam es zu geringeren Degenerationserscheinungen der ergriffenen Wurzeln. Sie wuchsen zu einer größeren Länge heran, blieben aber später gleichfalls im Wachstum zurück und erlangten nicht die ausgebildete Form der Wurzeln gesunder Keimlinge. Auch wurde nur hie und da ein Eindringen der Bakterien in die Wurzelhaubenzellen beobachtet.

Der einschlägigen Literatur ist zu entnehmen, daß Spaltpilze bereits als Ursache von Erkrankungen der Gerstenwurzeln erkannt wurden. So bespricht Vogel (8) eine eigenartige Krankheitserscheinung am Grünmalz, über deren Krankheitserreger allerdings nur die Vermutung ausgesprochen wurde, »es werde sich um einen Schädling handeln, der seinen Sitz voraussichtlich schon in der Gerste habe«. Begründet wird dies auch durch den Hinweis, daß die Krankheit in manchen Jahrgängen mehr, in manchen weniger oder gar nicht auftrete. Weitere Untersuchungen, die Ursache der Krankheit ausfindig zu machen, wurden jedoch nicht durchgeführt. Behrens (9) hatte bei seinen Studien »über die Schwankungen bei Keimkraftbestimmungen und ihre Ursachen« auch Gerste in den Kreis derselben gezogen und verschiedene Bakterienarten auf dieselbe einwirken lassen, aber nur eine sehr schwache Ausbreitung derselben, ohne nennenswerte Schädigung der Keimpflanzen, beobachtet. Im Jahre 1907 hat sich dann Schnegg (10) im Anhang an die Vogel'sche Arbeit mit der früher erwähnten Erkrankung des Grünmalzes beschäftigt und ihre bakterielle Ursache, deren Wirkung sowie ihre Bekämpfung zu ergründen versucht. Er fand, daß bei dieser Erkrankung die Gerstenwurzeln anfänglich gelbe Flecken bekommen, daß

dann später die Wurzelkeime immer welker werden, sich verfärben und schließlich absterben. Er machte weiter die Beobachtung, daß sich während dieser Degenerierung der Wurzel der Blattkeim sehr kräftig entwickelt, indem die Gesamtmenge der Reservestoffe des Keimlings, nach dem Absterben der Wurzel, allein zum Aufbau des Blattkeimes verwendet wird. Ferner konnte er auch eine durch die Krankheit entstandene anatomische Veränderung der ergriffenen Wurzeln an Dünnschnitten konstatieren, wobei er tiefgreifende Zersetzungserscheinungen an den peripheren Teilen der Wurzeln beobachtete.

Die Epidermiszellen erschienen ganz geschrumpft und zum Teil mit Bakterien gefüllt. Je älter die erkrankten Wurzeln wurden, um so mehr schritt die ursprünglich nur auf die Epidermis beschränkte Verschrumpfung nach innen vor. Diesem Vorschreiten der Zersetzung wurde erst durch das zentrale Gefäßbündel Halt geboten, dessen Außenzellen sehr verdickte und eng aneinander liegende Zellwände besitzen, welche für die Bakterien undurchdringbar waren. Als Erreger dieser Krankheit erkannte Schnegg ein Bakterium, welches dem bekannten Darmbakterium, *Bacterium coli commune*, sehr nahe steht, das aber vorläufig noch nicht genauer identifiziert, beziehungsweise beschrieben wurde.

Aus weiteren Beobachtungen ersah Schnegg, daß diese Bakterienart Würze unter Bildung von Selleriegeruch und starken Gärungserscheinungen, wobei Kohlensäure und Stickstoff neben anderen Gasen entstehen, zersetzt. Wie aus der vergleichsweisen Gegenüberstellung des genannten Organismus zu dem Kolibakterium hervorgeht, hatte Schnegg einen ganz anderen Mikroben in Händen, als irgendeinen der von mir beschriebenen, die auch keine so tiefgreifenden Zersetzungen an den Gerstenwurzeln herbeizuführen vermochten.

Ob die von mir isolierten Bakterienarten, wenn in virulenteren Formen auftretend, auch im Boden, in der Erde eine Wachstumshemmung der Gerstenwurzeln hervorrufen, will ich dahingestellt sein lassen, doch sei an dieser Stelle an die sogenannte Bodenmüdigkeit mancher Kulturpflanzen erinnert. Wenn eine Pflanze auf einem Boden nicht mehr gedeihen will,

so kann daran entweder ein Mangel an Nährstoffen, eine Erschöpfung des Bodens schuld sein oder die Bodenmüdigkeit wird durch die Gegenwart von tierischen oder pilzlichen Feinden der betreffenden Kulturpflanze herbeigeführt. Nach Ansicht Hiltner's entsteht unter dem Einfluß der Wurzelausscheidungen in einer gewissen Zone der Krume rings um die Wurzeln jeder Pflanze, in der sogenannten Rhizosphäre, eine eigenartig zusammengesetzte Bakterienflora. Am dichtesten ist die Ansiedlung solcher spezifischer Organismen in unmittelbarer Nähe der Wurzel. Es entsteht nach Ansicht Hiltner's eine Art Bakteriorhiza. Ist diese aus nützlichen Bodenorganismen zusammengesetzt, so erscheint die Bildung für die Pflanze vorteilhaft, mindestens unschädlich; finden sich aber ungebetene Gäste in Form von Schädlingen ein, so kann die betreffende Pflanze erkranken; so erkannte Kühn (11) als Verursacher der Rübenmüdigkeit eine parasitische Nematode. Kleemüdigkeit kann von der Gegenwart der parasitischen *Sclerotinia trifoliorum* im Boden herrühren. Die Flachsmüdigkeit wird nach Bolley (12) von *Fusarium lini* hervorgerufen. Nach Hiltner (13) ist der Reichtum gewisser Böden an pektinvergärenden Organismen die Ursache, daß manche Leguminosensamen (Erbsen etc.) auf solchen Böden nicht aufgehen, sondern faulen.

Linhart (14) beobachtete, daß gewisse Keimlingserkrankungen der Zucker- und Runkelrübe durch verschiedene im Boden verbreitete Bakterienarten, wie *Bacillus mycoides, Bacterium fluorescens liquefaciens*, *Bacillus mesentericus vulgatus* verursacht werden können. Unter Berücksichtigung vorstehender Tatsachen läßt sich daher vielleicht die Vermutung aussprechen, daß auch einer oder der andere der untersuchten Keime zu einem schwächeren Gedeihen der Gerstenpflanze in manchen Lagen, wie dies ja hie und da, trotz entsprechender Düngung des Bodens, beobachtet wird, beizutragen vermag und ist speziell bei *Bacterium fluorescens liquefaciens*, einem schwachen Fäulniserreger, unter Anziehung der Beobachtung Linhart's, der Gedanke nicht schlechthin von der Hand zu weisen, daß diese Bakterienart auch im Boden, bei stärkerer

Ausbildung der Virulenz, Schädigungen an den Gerstenwurzeln herbeizuführen vermag.

Daß sich die untersuchten Bakterien in großer Zahl an den Wurzeln der Gerste vermehrten, erscheint bei der Betrachtung der Chemie der Gerstenwurzel sehr plausibel. Ist dieselbe doch an leicht assimilierbaren Substanzen verhältnismäßig reich, so namentlich an Stickstoffverbindungen. Unter diesen ragt, wie besonders Lermer, später Brown und Millar nachwiesen, eine größere Menge von Asparagin hervor, daneben finden sich Allantoin, Betain, Cholin, Leucin und Tyrosin, lauter Körper, welche zu den leicht assimilierbaren Stickstoffquellen der Spaltpilze gehören. Tyrosin kommt zwar für die an der Wurzelspitze vegetierenden Organismen als Stickstoffquelle weniger in Betracht, da dieser Körper durch das an der Vegetationsspitze der Wurzel stets sich bildende Enzym, die Tyrosinase, leicht in die stickstofffreie Homogentisinsäure, in Ammoniak und Kohlensäure gespalten wird. Ferner sind noch höhere Spaltungsprodukte der eigentlichen Eiweißkörper, wie Proteosen, Peptone vorhanden, die ja auch eine treffliche Stickstoffquelle für Bakterien abgeben. Nach Lindet's (15) Forschungsergebnissen finden sich auch leicht assimilierbare Kohlehydrate in Form von Glukose und Fruktose im Zellsaft vor, deren Menge infolge der Einwirkung von spaltenden Enzymen (Schizasen) auf Disaccharide, beziehungsweise auf andere Abbauprodukte von Polysacchariden im Verlauf des Keimprozesses eine Zunahme erfährt. Auch die nötige Menge von Mineralstoffen ist vorhanden, welche in der ersten Vegetationsperiode dem Embryo aus dem Korn, später aus der Erde zugeführt werden. Obwohl die Form, in der sich diese Körper im Wurzelkeimling vorfinden, noch wenig studiert ist, so läßt sich doch sagen, daß auch sie in für Bakterien leicht assimilierbaren Verbindungen vorkommen, so namentlich die Phosphorsäure, welche teils als saures Salz an Kalium gebunden ist, teils in organischen Verbindungen vorkommt, so als Glyzerinphosphorsäure, als Proteinphosphorsäure und als Anhydrooxymethylendiphosphorsäure oder Phytin, welch letzteres ein Glukoproteid darstellt, das bei der Hydrolyse in Inosit und Phosphorverbindungen gespalten wird.

Im Anschluß an die Beantwortung der Pathogenitätsfrage der gefundenen Bakterien wurde schließlich noch ein mehr praktisches Moment ins Auge gefaßt, nämlich die Feststellung, ob nicht unter ihnen auch Schädlinge für die Zwischenprodukte, beziehungsweise für das Endprodukt der Bierdarstellung, also für Süßwürze, gehopfte Würze und fertiges Bier zu suchen sind. Es ist zwar anzunehmen, daß diese Bakterienarten, da sie nicht zu den sporulationsfähigen Spaltpilzen gehören, bei den hohen Temperaturen des Darrprozesses zugrunde gehen und auf dem Darrmalz, dem Ausgangsprodukt der eigentlichen Biererzeugung, nur mehr als Leichen anzutreffen sind, so kann doch daran gedacht werden, daß sie in Brauereien durch Verstäubung des Gerstenstaubes in die Würze der Kühlschiffe gelangen und hier zerstörend wirken.

In der Tat gelang es mir, durch Einimpfen der untersuchten Bakterienarten einerseits in Süßwürze, andrerseits in gehopfte Würze nachzuweisen, daß sämtliche Arten ganz gut in diesen Substraten fortkommen, sich vermehren und teilweise auch tiefgreifende Zersetzungen daselbst hervorrufen, wie aus folgender Tabelle hervorgeht.

Bact. fluor. liquef.	*Bact. herb. aur.* (var.)	*Bact. rubr.*	*Bact. herb. rubr.*
1. Süßwürze			
Nach zwei Tagen zeigt Nährboden schwache Trübung und geringe Hautbildung	Nach zwei Tagen zeigt Nährboden starke Trübung, starke Hautbildung	Nach zwei Tagen zeigt Nährboden schwache Trübung, schwache Hautbildung	Nach zwei Tagen zeigt Nährboden sehr starke Trübung und Hautbildung
Nach sechs Tagen starke Trübung, stärkere Hautbildung, flockige Ausscheidungen am Boden	Nach sechs Tagen ebenso, flockiges Sediment	Nach sechs Tagen starke Trübung, starke Hautbildung, flockiges Sediment	Nach sechs Tagen sehr starke Trübung und Hautbildung, die Würze wird fadenziehend

Bact. fluor. liquef.	*Bact. herb. aur.* (var.)	*Bact. rubr.*	*Bact. herb. rubr.*
2. Gehopfte Würze			
Nach zwei Tagen schwache Trübung, ohne Hautbildung	Nach zwei Tagen starke Trübung und Hautbildung	Nach zwei Tagen nur sehr schwache Entwicklung, ohne hervortretende Veränderung des Nährbodens	Nach zwei Tagen sehr starke Trübung und Hautbildung
Nach sechs Tagen starke Trübung, schwache Hautbildung; schwacher Selleriegeruch	Nach sechs Tagen starke Trübung und Hautbildung; deutlicher Selleriegeruch	Nach sechs Tagen schwache, kleinflockige Ausscheidungen, im Nährsubstrat schwimmend	Nach sechs Tagen sehr dichte Trübung und starke Hautbildung; Selleriegeruch; die Würze wird fadenziehend

Den Konkurrenzkampf mit gärender Bierhefe (*Saccharomyces* Frohberg) vermochte dagegen keine Art der untersuchten Bakterien aufzunehmen, wie aus Beobachtungen bei gleichzeitiger Einsaat einer möglichst gleich großen Individuenzahl der genannten Hefe und einer dieser Bakterien in Würze hervorgeht. Es konnte nach 14tägiger Beobachtungszeit bei 25° C. zwar eine kräftige Vermehrung der Hefezellen, aber keine Vermehrung der in Konkurrenz tretenden Bakterien konstatiert werden.

Zusammenfassung.

1. Auf Gerstenwurzeln kommt es sehr häufig bei Zuchtversuchen im Schönjahn'schen Keimapparat zu Bakterienzoogloeenbildungen.

2. Die Farbe derselben ist gewöhnlich eine gelbe, seltener eine rote.

3. Aus der gelben Zoogloeenbildung konnten drei Bakterienarten isoliert werden, und zwar häufig auftretend: *Bacterium fluorescens liquefaciens* und *Bacterium herbicola aureum* (var.), selten auftretend: *Bacterium rubrum*; aus der roten Zoogloeenbildung *Bacterium herbicola rubrum*.

4. Die Gerstenwurzeln werden in ihrem Wachstum behindert durch *Bacterium herbicola rubrum*, durch *Bacterium fluorescens liquefaciens* und namentlich durch eine Symbiose von *Bacterium fluorescens liquefaciens* und *Bacterium herbicola aureum* (var.).

5. Sämtliche isolierte Arten sind auch als Schädlinge sowohl für Süßwürze als auch für gehopfte Würze anzusehen, unterliegen aber im Konkurrenzkampfe mit Hefe.

Literatur.

(1) Beijerinck, Über Butylalkoholgärung. Koch's Jahrbuch, 1893, p. 258.
(2) Fribes, zit. nach Behrens.
(3) Behrens, Zentralbl. für Bakt., 2. T., Bd. VIII, p. 205.
(4) Burri, Zentralbl. für Bakt., 2. T., Bd. X, p. 756.
(5) Düggeli, Zentralbl. für Bakt., 2. T., Bd. XII, p. 602, p. 695; Bd. XIII, p. 56, p. 198.
(6) Hoffmann, Wochenschr. für Brauerei, XIII, 1896, Nr. 44.
(7) Chrzaszcz, Wochenschr. für Brauerei, XIX, 1902, Nr. 40.
(8) Vogel, Klein- und Mittelbrauer, 1902, p. 42, und Zeitschr. für das gesamte Brauwesen, 1905, p. 242.
(9) Behrens, Bericht der landwirtschaftl. Versuchsanstalt Augustenburg, ref. Zentralbl. für Bakt., 2. T., XIV, p. 146.
(10) Schnegg, Zeitschr. für das gesamte Brauwesen, XXX, p. 576, 588, 600, 608, 623, 630.
(11) Kühn, Bericht aus dem physiolog. Labor. Universität Halle, Heft 3; siehe auch Lafar's Handbuch der Mykologie.
(12) Bolley, Nord-Dacota Agric. College, Nr. 50, p. 1901.
(13) Hiltner, Arbeiten an der biolog. Abteilung, Kais. Gesundheitsamt, 1902, Bd. 3, p. 1; siehe auch Lafar's Handbuch der Mykologie.
(14) Linhart, Zentralbl. für Bakteriologie, 2. T., 1899, Bd. 5, p. 221.
(15) Lindet, Compt. rendus de l'Académie des sciences, 1903, p. 73.
